

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



**Estudo comparativo da ação microbiana de irrigantes  
endodônticos alternativos recorrendo a ativadores físicos**

Ana Beatriz de Cristino Roque Jordão Pereira

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2015

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



**Estudo comparativo da ação microbiana de irrigantes  
endodônticos alternativos recorrendo a ativadores físicos**

Ana Beatriz de Cristino Roque Jordão Pereira

Dissertação orientada pelo Professor Doutor António Ginjeira

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2015

## **Agradecimentos**

À minha família e amigos pela motivação e ajuda quando o trabalho mais apertou.

Agradeço todo o trabalho, acompanhamento e ajuda ao Professor Doutor António Ginjeira e ainda toda a disponibilidade para procurar e fornecer algum material necessário para a execução prática do trabalho. Pelo tempo perdido e preciosa orientação durante todo o meu percurso académico.

Ao Doutor Luís Tavares, Professor Catedrático de Microbiologia e Imunologia, Presidente do Conselho Directivo da FMVULisboa e director do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), pela disponibilidade para colaborar na execução do protocolo experimental.

À Mestre Carla Carneiro, do CIISA\_FMVUL pela simpatia e amizade e por colaborar comigo e disponibilizar as instalações, assim como tempo para ensinar e guiar, na elaboração do trabalho experimental.

Ao Doutor Ricardo Bexiga, do CIISA- FMVUL pela disponibilidade para colaborar na execução do protocolo experimental deste trabalho.

À Professora Doutora Sofia Oliveira pela disponibilidade, tempo e simpatia durante o período de utilização do SEM.

Ao Professor Auxiliar da FMDUL, Dr. Henrique Soares Luís, pela disponibilidade, tempo e orientação no tratamento de dados estatísticos.

Às assistentes dentárias Isabel Bagão, Catarina Noronha e Cristina Mendes, pelo material, pelo espaço disponibilizado, e por todo o tempo que ofereceram para que a amostra da tese pudesse ser preparada.

.

## Resumo

**Objetivos:** Estudar a ação antimicrobiana do irrigante alternativo Ácido Peracético, e também a eficácia do ativador físico (PDT), como coadjuvante da ação antimicrobiana, através da análise do crescimento bacteriano nos dentes e em cones de papel, por observação de turbidez do meio Brain Heart Infusion Broth (BHIB).

**Método:** Foram preparados, isolados e esterilizados 30 dentes de estudo e 12 dentes de controle. Foi isolada a estirpe de *Enterococcus faecalis* de referência (ATCC 29212) para o meio de Agar Columbia, suplementada com 5% de sangue de carneiro e realizada a curva de calibração. Definiram-se três protocolos de irrigação a utilizar em cada um dos grupos (n=10). Verificou-se a eficácia na eliminação de biofilmes de *E. faecalis* para cada protocolo definido: No grupo 1, avaliou-se a eficácia do Hipoclorito de Sódio a 5%; No grupo 2, avaliou-se a eficácia do Ácido Peracético a 1%; No grupo 3, avaliou-se a eficácia da combinação do Ácido Peracético a 1% com a Terapia Fotodinâmica. Os resultados foram tratados estatisticamente através da realização do teste não paramétrico Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com nível de significância de 5%.

**Resultados:** No grupo 1 e no grupo 2 registaram-se diferenças no crescimento bacteriano entre os dentes e os cones. No grupo 3, o crescimento microbiano não apresentou diferenças no crescimento entre dentes e cones. Não se verificaram diferenças entre os três tipos de protocolo de irrigação no grupo de dentes, mas registaram-se diferenças significativas nos resultados obtidos nos cones de papel. Na análise qualitativa da morfologia radicular através do SEM verificou-se que o Ácido Peracético possui ação quelante.

**Conclusões:** O Ácido Peracético a 1% é um irrigante alternativo, com ação antimicrobiana semelhante ao Hipoclorito de Sódio a 5% e apresenta ação quelante.

**Palavras-Chave:** *Enterococcus faecalis*, Ácido Peracético, Hipoclorito de Sódio, Terapia Fotodinâmica.

## Abstract

**Objectives:** To study the antimicrobial action of the alternative irrigating Peracetic Acid, and also the effectiveness of physical activator (PDT) as coadjuvante antimicrobial action, by analysis of bacterial growth on teeth and paper cones for turbidity observation middle Brain Heart Infusion Broth (BHib).

**Materials and methods:** 30 teeth study and 12 control teeth were prepared, isolated and sterilized. A reference strain of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) was isolated to Columbia agar supplemented with 5% sheep blood and a calibration curve performed. Three irrigation protocols were defined to be used in each group (n = 10). The effectiveness in eliminating *E. faecalis* biofilms was evaluated for each protocol defined: Group 1, the efficacy of Sodium Hypochlorite 5%; In group 2, the efficacy of Peracetic Acid 1%; In group 3, we evaluated the efficacy of the combination of Peracetic Acid 1% with photodynamic therapy. The results were statistically analyzed by conducting the nonparametric chi-square ( $\chi^2$ ) test with 5% significance level.

**Results:** In group 1 and group 2 there were differences in bacterial growth between teeth and cones. In group 3, microbial growth showed no differences in growth between teeth and cones. There were no differences among the three types of irrigation Protocol teeth group but there were significant differences in the results obtained in paper cones. In qualitative analysis of root morphology by SEM it was found that Peracetic has acid chelating action.

**Conclusion:** Peracetic Acid 1% is an alternative irrigant with antimicrobial action similar to Sodium Hypochlorite 5% and presents chelating action.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, Peracetic Acid, Sodium Hypochlorite, Photodynamic Therapy.

## Índice

Resumo .....	iv
Abstract.....	v
Índice de tabelas .....	vii
Índice de figuras .....	viii
Índice de abreviaturas .....	ix
1. Introdução.....	10
2. Objectivos.....	17
3. Materiais e métodos - Protocolo experimental .....	19
4. Resultados.....	25
5. Discussão .....	29
6. Conclusão .....	35
7. Referências Bibliográficas.....	36
8. Anexo A – Tabelas e Gráficos.....	41
9. Anexo B – Figuras .....	43

## **Índice de tabelas**

Tabela 1 – Grupos de estudo .....	20
Tabela 2 – Grupos de dentes controlo .....	20
Tabela 3 – Análise de crescimento dos dentes e cones no grupo do Hipoclorito de Sódio a 5% .....	25
Tabela 4 – Relação entre dentes e cones do grupo Hipoclorito de Sódio a 5% .....	25
Tabela 5 - Análise de crescimento dos dentes e cones no grupo do Ácido Peracético a 1% .....	26
Tabela 6 - Relação entre dentes e cones do grupo Ácido Peracético a 1% .....	26
Tabela 7 - Análise de crescimento dos dentes e cones no grupo do Ácido Peracético a 1% e PDT .....	26
Tabela 8 - Relação entre dentes e cones do grupo Ácido Peracético a 1% e PDT .....	26
Tabela 9 - Relação entre os irrigantes na desinfecção dos dentes da amostra .....	27
Tabela 10 - Relação entre os irrigantes na desinfecção dos cones da amostra .....	27
Tabela 11 – Tabela de absorvâncias .....	41

## Índice de figuras

Figura 1 – Compilação de imagens em SEM, ampliação 1000x, dos dentes controlo A e D e dos grupos 2 e 3 .....	28
Figura 2 – Estabelecimento da linha guia para secção da coroa .....	43
Figura 3 - Secção da coroa .....	43
Figura 4 – Comprimento Radicular .....	43
Figura 5 - Inoculação em meio TSA .....	43
Figura 6– Contagem de microcolónias .....	43
Figura 7 - Dente e cones não contaminados .....	43
Figura 8 - Dente e cone contaminados (Turbidez do meio) .....	43
Figura 9 - Metalizadora .....	44
Figura 10 - – Processo de metalização .....	44
Figura 11 - Amostra com película de liga Ouro-Paládio .....	44
Figura 12- SEM .....	44
Figura 13- SEM .....	44



## Índice de abreviaturas

*E. faecalis* – *Enterococcus faecalis*

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

CHX – Clorohexidina

EDTA – Ácido Etilenodiaminotretaacético

SEM – *Scanning Electron Microscope* (Microscópio de Varrimento)

NiTi – Liga de Níquel-Titânio

PDT – *Photodynamic Therapy* (Terapia Fotodinâmica)

COS - Agar columbia + 5 % sangue de Carneiro

SB - Slanetz & Bartley Agar

BHIb - Brain Heart Infusion Broth

TSA - Triptona Soya Agar

$\chi^2$  – Teste do Qui-Quadrado (Análise Não-Paramétrica)

## 1. Introdução

As doenças pulpares e periapicais são patologias de ordem inflamatória e componente imunológica que têm como fator etiológico principal, a invasão do espaço canalar por bactérias presentes na cavidade oral. (Guerreiro-Tanomaru J., Morgental R., Faria-Junior N., Berbert F., Tanomaru-Filho M., 2011)

Para um tratamento endodôntico convencional corretamente efetuado, existem objetivos a ser cumpridos que incluem a desinfecção canalar para remover os microrganismos invasores e patogênicos na sua totalidade, a preparação intracanal para remover material orgânico, como restos de polpa necrótica juntamente com restos de microrganismos e seus produtos metabólicos, a remoção de material inorgânico, como dentina infetada, a modelação dos canais para melhor obturação e, por fim, a obturação dos canais e a restauração definitiva, direta ou indireta. (Brito P. *et al*, 2009; Cobankara F. K., Erdogan H., Hamurcu M., 2011)

Sabendo que o sucesso do tratamento endodôntico é influenciado pelo cumprimento, ou não, dos objetivos anteriormente mencionados, e que existem bactérias persistentes com capacidade de induzir, ou manter, uma infecção endodôntica, têm sido realizados inúmeros estudos para definir o melhor protocolo de irrigação canalar que não seja tóxico, que seja biocompatível, que exiba boa capacidade antimicrobiana com rápida ação e que tenha capacidade de dissolver tecidos orgânicos e necróticos. Deverá também, ser capaz de manter os detritos em suspensão, apresentar estabilidade em solução aquosa, ser ativo em diferentes níveis de pH e ainda ter a capacidade de remover a *smear layer* para, posteriormente, se obter uma obturação estanque e duradoura. (Cobankara F. K., 2011; Guerreiro-Tanomaru J., 2011; Arias-Moliz M.T. *et al*, 2014)

### 1. *Enterococcus faecalis*

A *Enterococcus faecalis* é um coco Gram-positivo anaeróbio facultativo, presente no ambiente oral humano que tem sido extensivamente estudada, uma vez que, é frequentemente encontrada em infecções endodônticas primárias e refratárias. No entanto, a participação desta espécie na patogênese das infecções endodônticas ainda não está inteiramente esclarecida. (Chau N. P.T., Chung N-H., Jeon J. G., 2014; Bachtiar E. W., Bachtiar B. M., Dewiyani S., Akbar S. M., 2015)

A expressão da cápsula de *E. faecalis* poderá ser considerada um dos principais determinantes no desencadeamento de uma lesão periapical assim como, a atividade da hemolisina, gelatinase, lipase, e DNase, enzimas que compõem o potencial patogénico da bactéria e também, a formação de biofilme. (Cord C.B., Velasco R., Lima L., Rocha D., Bueno C., Pinheiro S.L., Março 2014; Dworniczek E., Piwowarczyk J., Seniuk A., Gosciniak G., 2014; Bachtar E. W. 2015) A formação de biofilme dá-se em três fases principais: ligação de bactérias e formação de microcolónias, dissolução do substrato de dentina mineralizada e libertação de cálcio e iões de fosfato, dando-se a progressão de mineralização e calcificação do biofilme. (Zand V. Milani A. S., Amini M., Barhaghi M., Lofti M., Rikhtegaran S., Sohrabi A., 2014) A maturidade do biofilme é conhecida por influenciar a resistência a agentes antibacterianos, assim como tolerância ao pH elevado do hidróxido de cálcio e a longos períodos sem substrato nutritivo, sendo que ainda não é conhecida a razão para esta dificuldade de erradicação dos microrganismos. (Guerreiro-Tanomaru J., 2011; Hohnscheidt G. L., Bottcher D. E., Parolo C., Montagner F., Grecca F., 2013; Chau N. P.T., 2014)

O maior conteúdo mineral da dentina esclerosada, bem como o colagénio superficial da raiz, podem afetar a adesão bacteriana. A profundidade de invasão tubular da *E. faecalis* em dentes com dentina envelhecida quando comparada com a de dentes jovens, sugere que os túbulos esclerosados poderão impedir fisicamente a invasão bacteriana da dentina. Sabe-se que a dentina esclerótica induzida pelo envelhecimento exibe maior conteúdo mineral como também, um encerramento progressivo dos túbulos dentinários. Continua por clarificar se as diferenças na adesão bacteriana serão devidas às alterações induzidas pela idade ou se pela formação de mais camadas no interior dos túbulos dentinários. (Ozdemir H. O., Buzoglu H. D., Calt S., Stabholz A., Steinberg D., 2010)

## 2. Irrigantes

### 2.1 Ácido Peracético

Sendo o Ácido Peracético, um agente irrigante pouco conhecido e estando a sua utilização pouco difundida na envolvente de Endodontia, foi escolhido para este estudo com o fim de averiguar a sua eficácia como agente antimicrobiano e para esclarecer se realmente possui uma ação quelante. O Ácido Peracético é um peróxido orgânico, com

poder de desinfetante químico de amplo espectro antimicrobiano, que se pode formar a partir da reação química entre o ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) numa solução aquosa, ou pela reação do tetracetiletenodiamino com a solução alcalina de peróxido de hidrogénio. (Sagsen B., Ustun Y., Aslan T., Çanakçı B. C., 2012; Szczepanski F, Szczepanski CR, Berger SB, Consani RL, Gonini-Junior A, Guiraldo RD., 2014) Este ácido tem elevada reatividade química, podendo conduzir a fortes reações quando em contacto direto com os olhos, pele e trato respiratório. (Pechacek N., Osorio M., Caudill J., Peterson B., 2014)

A capacidade de penetrar de forma mais eficiente em células microbianas que a molécula do peróxido de hidrogénio, resulta numa disrupção da membrana celular e bloqueio de sistemas de transporte dos microrganismos. (Koivunen J., Heinonen-Tanski H., 2005) Este ácido mostra-se eficaz na desinfeção de resina acrílica, na esterilização de equipamento dentário, tendo ação bactericida, viricida, fungicida e esporicida. (Lottanti S., Gautschi H., Sener B., Zehnder M., 2009; Cord C.B., 2014; Szczepanski F., 2014)

Apesar deste irrigante ser capaz de se difundir no interior de um agregado bacteriano, vai observar-se uma resistência da *E. faecalis* ao stress oxidativo induzido pelo ácido, que poderá dever-se à presença de enzimas desintoxicantes tais como as peroxidases e catálases. (Koivunen J., 2005) A ação do Ácido Peracético está dependente do tempo de aplicação e também da concentração, à semelhança do NaOCl. (Sagsen B., 2012; Arias-Moliz M.T., 2014) A baixa concentração de Ácido Peracético (1%), mostrou ser capaz de reduzir cerca de 86% de um biofilme de *Enterococcus faecalis* em 3 minutos, e foi capaz de eliminar por completo a população de *E. faecalis* em 10 minutos. Estes resultados demonstram o potencial antimicrobiano do Ácido Peracético, podendo constatar-se, no entanto, uma ação mais morosa de que com o Hipoclorito de Sódio (NaOCl) em concentrações de 2,5% e com a Clorohexidina (CHX) em concentrações de 2%, que têm a capacidade de atuar e eliminar colónias de *E. faecalis* em cerca de 30 segundos. (De-Deus G., Souza E.M., Marins J. R., Reis C., Paciornik S., Zehnder M., 2011; Guerreiro-Tanomaru J., 2011; Cord C.B., 2014)

O Ácido Peracético tem a capacidade de reduzir de forma significativa os iões de magnésio, fósforo e potássio presentes na dentina radicular, tendo no entanto, um comportamento menos eficaz que outras soluções irrigantes com ação quelante, como o

EDTA, ácido cítrico e Etidronato. (Cobankara F. K., 2011; Cord C.B., 2014) No estudo de Cord *et al*, referiu-se que uma concentração de Ácido Peracético de 2,25% obtinha resultados semelhantes ao EDTA a 17% na remoção de *smear layer*, e que uma concentração de 2,25% de Ácido Peracético se revela cáustica para a mucosa oral e que pode levar a erosão da dentina. (Cord C.B., 2014)

## 2.2 EDTA

O EDTA, é um agente de irrigação usado em endodontia pela sua ação quelante, que se caracteriza pela reação dos íons de cálcio presentes na porção inorgânica da dentina radicular com o irrigante, levando à formação de sais de cálcio solúveis. (Kandaswamy D., Venkateshbabu N., 2010) Segundo a literatura, o EDTA reduz a energia de superfície da dentina radicular podendo influenciar a natureza de adesão bacteriana, as forças de adesão e a formação de biofilme de *E. faecalis* na raiz. (Ozdemir H. O., 2010) Tem sido relatado que a dentina fica desmineralizada a uma profundidade de 20-30nm em apenas 5 minutos de ação do agente quelante. O tempo para remoção da *smear layer* com uma aplicação contínua de 5 ml de EDTA, numa concentração de 17% como irrigante final foi de 3 minutos. (Kandaswamy D., 2010) A utilização de potenciadores de ação, nomeadamente os ultrassons, permite que a aplicação por um minuto de EDTA a 17%, seja eficaz na remoção da *smear layer* e dos resíduos acumulados na região mais apical do canal. (Kandaswamy D., 2010)

A reação entre o Hipoclorito de Sódio e CHX produz um produto cancerígeno, o precipitado de paracloroanilina, que é um sal neutro insolúvel formado pela reação ácido-base, e também, quando combinados ambos os irrigantes num protocolo de irrigação alternada, há um aumento significativo da tensão superficial da dentina radicular. (Kandaswamy D., 2010)

No estudo de Ozdemir *et al*, a utilização de EDTA ou NaOCl de forma singular, teve efeitos de adesão bacteriana semelhantes, com menor qualidade que a irrigação dos dois agentes combinados. Este resultado parece apoiar a noção de que a adesão bacteriana da *E. faecalis* pode também ser o resultado de uma interação física não específica baseada nas propriedades da superfície dentinária, e não numa interação específica de ligação ao colagénio da dentina radicular. (Ozdemir H. O., 2010)

## 2.3 Hipoclorito de Sódio

O Hipoclorito de Sódio (NaOCl) é um agente antimicrobiano de largo espectro que cumpre a maioria dos critérios para um irrigante endodôntico ideal. Encontra-se amplamente difundido na prática clínica, e devido ao efeito dos íons hidroxilo e cloraminação, tem a capacidade de inativar irreversivelmente enzimas bacterianas essenciais. Isto é, com a saída de íons hidroxilo, há uma redução do pH. Quando o ácido hipocloroso (HOCl-), presente na solução de Hipoclorito de Sódio, entra em contacto com os tecidos orgânicos, atua como um solvente de proteínas, libertando íons hipoclorito (OCl-) que se combinam com o grupo amino (NH) formando cloraminas que interferem no metabolismo celular. (Cord C.B., 2014) É também capaz de dissolver o tecido orgânico que contém ácidos gordos e lípidos, através de uma reação de saponificação. (Yap B., Zilm P. S., Briggs N., Rogers A. H., Cathro P. C., 2014) Ao atuar como um solvente orgânico e de gordura, degrada ácidos gordos, transformando-os em sais de ácidos gordos (sabão) e glicerol (álcool), reduzindo assim a tensão superficial da solução. (Kandaswamy D., 2010; Cord C.B., 2014) Assim, as reações de saponificação, de neutralização de aminoácidos e cloraminação que ocorrem na presença de microrganismos, contribuem para o processo de dissolução de tecidos e efeito antimicrobiano, alterando as funções metabólicas das bactérias mantendo as condições pouco favoráveis para os microrganismos. (Kandaswamy D., 2010; Cord C.B., 2014)

O NaOCl conduz a uma diminuição da força de ligação entre a dentina e cimentos de resina e pode requerer um agente de reversão, devido à sua capacidade de afetar a polimerização da resina selante. Agentes tais como, o ácido ascórbico ou ascorbato de sódio, têm mostrado reverter completamente esta redução na resistência de união. (Baca P., Mendonza-Llamas M. L., Arias-Moliz M. T., Rodriguez M., Ferrer-Luque C. M., 2011) A redução da resistência de união, visto entre sistemas adesivos e paredes da dentina, pode ser devido à remoção das fibrilhas de colagénio por ação do Hipoclorito de Sódio, impedindo a formação de uma camada híbrida consistente. (Kandaswamy D., 2010)

Muitos estudos têm demonstrado que a atividade antibacteriana de NaOCl depende da sua concentração, tempo de contacto, pH e temperatura. (Chau N. P.T., 2014) As propriedades antibacterianas e de dissolução tecidual do NaOCl a 5,25%,

sofrem uma diminuição quando o irrigante é diluído. (Olivi G., *et al* 2014) Um aumento na temperatura de 25 °C aumentou a eficácia de NaOCl num fator de 100. A capacidade do Hipoclorito de Sódio a 1% a 45 ° C dissolver polpas dentárias humanas é igual ao de uma solução a 5,25% a 20 ° C. (Kandaswamy D., 2010) A aplicação de potenciadores de ação, nomeadamente o uso de agitação ultrassônica, aumenta a eficácia do NaOCl a 5%, no terço apical da parede do canal. (Kandaswamy D., 2010)

### 3. Terapia fotodinâmica (PDT)

A ativação dos irrigantes parece ser um importante método de aumentar a atividade antibacteriana e antibiofilme dos irrigantes endodônticos, não só dentro do canal, mas também no sistema de canais radiculares que exhibe complexidades anatômicas, como por exemplo canalículos acessórios e túbulos dentinários. (Cheng X., Guan S., Lu H., Zhao C., Chen X., Li N., Bai Q., Tian Y., Yu Q., 2012) Têm sido estudados e testados como potenciais métodos de ativação de irrigantes em endodontia, agentes sônicos, ultrassônicos e laser. Os vários sistemas de laser estudados, têm sido aplicados por si só ou juntamente com irrigantes endodônticos, em diferentes modelos de canais radiculares infetados, sendo que a maioria dos estudos mostrou resultados favoráveis em relação à redução bacteriana. A maioria das pesquisas neste campo tem-se concentrado na aplicação do laser Nd: YAG, Er: YAG, Er, Cr: YSGG e terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT). (Cheng X., 2012)

A terapia fotodinâmica (PDT), é um tratamento que utiliza a ativação de um agente de fotossensibilização (fotossensibilizador) por exposição à luz de um comprimento de onda específico, que varia entre 630 e 700 nm, na presença de oxigénio. (Fonseca M. B., *et al* 2008; Yao N., Zhang C., Chu C., 2012; Ok E., Ertas H., Saygili G., Gok T., 2013; Dworniczek E., 2014; Zand V., 2014) Os principais fotossensibilizantes encontrados na literatura são derivados da Hematoporfirina (620-650 nm), fenotiazina, como azul de toluidina e azul-de-metileno (620-700 nm), cianina (600-805 nm), fitoterápicos (550-700 nm) e hitalocianinas (660-700 nm). (Fonseca M. B., 2008; Cheng X., 2012; Yao N., 2012; Ok E., 2013; Dworniczek E., 2014; Tennert C., *et al* 2014; Zand V., 2014) Os fotossensibilizadores têm um elevado grau de seletividade para matar microrganismos, sem afetar a viabilidade da célula hospedeira e o aumento da temperatura característico do protocolo com PDT, não é tóxico para os

tecidos vitais, nomeadamente para os tecidos periodontais, uma vez que está abaixo do limiar fisiológico dos tecidos. (Yao N., 2012; Bago I, Plečko V, Gabric' Panduric' D, Schaperl Z, Baraba A, Anic' I., 2013) A eficácia antibacteriana da PDT depende da duração da exposição de luz, da concentração de fotossensibilizador, da absorvância do fotossensibilizador, da energia da luz, da introdução de uma fibra ótica no interior do canal e da intensidade da luz emitida. (Zhao Y., Knøchel S., Siegumfeldt H., 2014) O pico de absorção do fotossensibilizador deve coincidir com o comprimento de onda da luz usada para o respetivo agente sensibilizador, havendo transferência de energia ao oxigénio disponível, resultando na formação de espécies tóxicas de oxigénio, que serão responsáveis pela morte bacteriana. (Souza L. *et al*, 2010) Geralmente, a absorção da luz emitida pelo PDT, ativa por excitação o fotossensibilizador, que poderá eliminar as células diretamente através da formação de radicais livres altamente reativos (Tipo I) ou então, reagir com o oxigénio molecular e criar uma espécie reativa secundária de oxigénio, que causa disrupção das funções celulares (Tipo mecanismo II). (Johns D. A., Shivashankar V. Y., Krishnamma S., Johns M., 2014)

A grande vantagem do PDT é a baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana. (Dworniczek E., 2014) Tem sido documentado, um elevado nível de eficácia do PDT contra células planctónicas de Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e *Mycobacterium*. (Dworniczek E., 2014) O PDT não só mata as bactérias, como também pode levar a desintoxicação de endotoxinas, tais como lipopolissacáridos, que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias por parte do hospedeiro. (Zand V., 2014) No entanto, para as espécies pigmentadas de preto como, *Porphyromonas* e *Prevotella*, que são incapazes de absorver diretamente luz laser na região do vermelho do espectro, o PDT não se mostra eficaz na sua erradicação. (Fonseca M. B., 2008)

Estudos indicam que o efeito de PDT atua como adjuvante na endodontia convencional, conduzindo a uma redução significativa da carga bacteriana após a irrigação utilizando Hipoclorito de Sódio, peróxido de hidrogénio e EDTA, sendo eficaz contra as bactérias multirresistentes a antimicrobianos. (Tennert C., 2014) O PDT tem sido utilizado recentemente, para aumentar a penetração do efeito da desinfeção nos túbulos dentinários. (Ok E., 2013)



## 2. Objectivos

Este trabalho tem como principal objetivo estudar a ação antimicrobiana do irrigante alternativo Ácido Peracético, e também da efetividade do ativador físico (PDT) como coadjuvante da ação antimicrobiana.

Concretizou-se o objetivo principal através dos seguintes objetivos específicos:

Analisar a ação microbiana do Hipoclorito de Sódio, na eliminação de *Enterococcus faecalis* em dentes e cones, no final do período de incubação (72h), de acordo com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: O crescimento bacteriano, nos dentes e nos cones, é igual quando é feita a irrigação com Hipoclorito de Sódio a 5%.

H<sub>1</sub>: O crescimento bacteriano, nos dentes e nos cones, é diferente quando é feita a irrigação com Hipoclorito de Sódio a 5%.

Analisar a ação microbiana do Ácido Peracético, na eliminação de *Enterococcus faecalis* nos dentes e cones, no final do período de incubação (72h), de acordo com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: O crescimento bacteriano, nos dentes e nos cones, é igual quando é feita a irrigação com Ácido Peracético a 1%.

H<sub>1</sub>: O crescimento bacteriano, nos dentes e nos cones, é diferente quando é feita a irrigação com Ácido Peracético a 1%.

Analisar a ação microbiana do Ácido Peracético coadjuvado com o PDT, na eliminação de *Enterococcus faecalis* nos dentes e cones, no final do período de incubação (72h), de acordo com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: O crescimento bacteriano, nos dentes e nos cones, é igual quando é feita a irrigação com Ácido Peracético a 1% coadjuvada com a Terapia Fotodinâmica (PDT).

H<sub>1</sub>: O crescimento bacteriano, nos dentes e nos cones, é diferente quando é feita a irrigação com Ácido Peracético a 1% coadjuvada com a Terapia Fotodinâmica (PDT).

Analisar a eficácia antimicrobiana dos irrigantes dos três grupos de estudo, através da análise da presença de *Enterococcus faecalis* nos dentes, no final do período de incubação (72h), de acordo com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: Os irrigantes definidos para os três grupos de estudo, não apresentam diferenças na desinfecção obtida nos dentes da amostra.

H<sub>1</sub>: Os irrigantes definidos para os três grupos de estudo, apresentam diferenças na desinfecção obtidas nos dentes da amostra.

Analisar a eficácia antimicrobiana dos irrigantes dos três grupos de estudo, através da análise da presença de *Enterococcus faecalis* nos cones de papel, no final do período de incubação (72h), de acordo com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: Os irrigantes definidos para os três grupos de estudo, não apresentam diferenças na desinfecção obtida através dos cones de papel.

H<sub>1</sub>: Os irrigantes definidos para os três grupos de estudo, apresentam diferenças na desinfecção obtidas através dos cones de papel.

### **3. Materiais e métodos - Protocolo experimental**

Foi seleccionada uma amostra homogénea de 42 dentes, segundo os critérios de dentes uniradiculares, com um canal e comprimento radicular médio de 14-15mm, medido desde a junção amelo-cementária ao ápex dentário. Do total de dentes obtidos, 68, foram rejeitados 26 dentes, pois não cumpriam os critérios de seleção definidos para a composição da amostra deste estudo.

Terminada a seleção de dentes, procedeu-se à destartarização minuciosa de toda a amostra e de seguida, à secção da coroa dentária da raiz do dente, com recurso a peça de mão e um disco de tungsténio. Posteriormente, realizou-se a instrumentação dos dentes da amostra com limas ProTaper Universal, iniciando o protocolo de instrumentação com o estabelecimento da via de permeabilidade com limas Kerr nº10 e nº15. A instrumentação definida incluiu as limas de endodontia mecanizada S1, S2, F1 e F2, com irrigação com Hipoclorito de Sódio a 2,5% e permeabilidade com limas Kerr nº 10 entre cada lima ProTaper. Os dentes foram sempre conservados em água para manter a hidratação dos mesmos.

Posteriormente, e para fins de isolamento, pintaram-se os dentes com verniz, seguindo-se da esterilização de toda a amostra em autoclave a 134°C num ciclo de 50 minutos.

Os 42 dentes seleccionados e tratados, foram divididos por três grupos teste (n=30) e por três grupos controlo (n=12) por cada grupo teste. Cada grupo teste testava a eficácia de um método de desinfeção canalar diferente. No grupo 1 (n=10) testou-se a eficácia na desinfeção do Hipoclorito de Sódio a 5%, no grupo 2 (n=10) testou-se a eficácia antimicrobiana do Ácido Peracético a 1% e, finalmente, no grupo 3 (n=10) testou-se a capacidade de desinfeção do Ácido Peracético a 1% coadjuvado com a ação da Terapia Fotodinâmica.

Constituiu-se um grupo controlo (n=4) para cada grupo de estudo como método de averiguação da qualidade da progressão do estudo. Para tal, três dentes foram inoculados com a estirpe referência e um dente com meio de cultura estéril (Brain Heart Infusion broth). O controlo A (n=1) colocou em teste as condições de incubação, ou seja, se a estirpe inoculada se mantinha viável ao longo das 48 h de incubação, o controlo B (n=1) testou se o Tiossulfato de Sódio não tinha acção letal sobre a estirpe

controle e o controle C (n=1) testou-se a capacidade inibitória do Tiosulfato de Sódio sobre o Hipoclorito de Sódio/Ácido Peracético. O controle negativo, controle D (n=1), foi um dente inoculado com BHib estéril para aferir a esterilidade do meio e das condições de incubação/manipulação.

**Tabela 1 – Grupos de estudo**

<b>Grupos de Estudo</b>	
<b>Grupo 1</b>	Hipoclorito de Sódio 5%
<b>Grupo 2</b>	Ácido Peracético 1%
<b>Grupo 3</b>	Ácido Peracético 1% + PDT

**Tabela 2 – Grupos de dentes controle**

<b>Grupo de dentes controle</b>	
<b>Controle 1</b>	Inoculado com <i>E. faecalis</i>
<b>Controle 2</b>	Inoculado com <i>E. faecalis</i> e Tiosulfato de sódio
<b>Controle 3</b>	Inoculado com <i>E. faecalis</i> e mistura de Tiosulfato de Sódio e Hipoclorito de Sódio (Grupo 1)/Ácido Peracético (grupo 2 e 3)
<b>Controle 4</b>	Meio BHib estéril

Preparação da estirpe referência:

Isolou-se a estirpe referência de *E. faecalis* (ATCC 29212) para agar columbia suplementado com 5% sangue de carneiro (COS) (bioMérieux) e incubou-se durante 24 horas a 37°C (1ª passagem). Para confirmar a pureza da cultura, realizou-se uma coloração de Gram e isolou-se uma colônia para uma nova placa de COS, deixando-se a incubar durante 18 h a 37°C (2ª passagem).

Para os protocolos de infecção, só se utilizaram culturas de *E. faecalis* com duas passagens prévias em meio de cultura sólido (COS).

#### Curva de calibração:

Foi preparada uma suspensão de turbidez desconhecida da estirpe ATCC 29212, em 9 ml de soro fisiológico a 0,9%. De seguida, transferiu-se 1 ml de soro fisiológico estéril (branco) e 1 ml da suspensão inicial para duas cuvets de espectrofotometria de forma a proceder à leitura da densidade óptica (d.o. = 600 nm) da suspensão inicial ( $10^0$ ) e registou-se o seu valor. Posteriormente, procedeu-se à elaboração de diluições decimais de base 10 (volume final = 5 ml) até esgotamento do inóculo, de acordo com a leitura de d.o. previamente efetuada. Seguidamente, inoculou-se em meio de Triptona Soya Agar (TSA), à superfície e em duplicado, 100 µL das diluições ( $10^{-4}$  a  $10^{-7}$ ) e incubou-se a 37°C durante 24 h. Finalmente, de forma a registar os valores de d.o. das primeiras três diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ), transferiu-se 1 ml de soro fisiológico estéril (branco) e 1 ml das respectivas diluições para quatro cuvets e procedeu-se à leitura da sua densidade óptica (d.o. = 600 nm) (tabelas 3, 4 e 5 em anexo).

Após período de incubação, efetuou-se a contagem de todas as placas que contivessem entre 15 e 150 unidades formadoras de colónias/ml (ufc/ml). O protocolo foi repetido três vezes em três dias consecutivos.

O cálculo do número de unidades formadoras presentes em cada um das suspensões iniciais (dia 1, 2 e 3) foi determinado de acordo com a fórmula:

$$\text{ufc/ml} = \text{média de número de colónias} \times \text{inverso da diluição} \times \text{factor diluição}^1$$

#### Inoculação dos dentes:

Preparou-se uma suspensão em 5 ml de soro fisiológico a partir de uma cultura de *E. faecalis* com 24 h de crescimento. Seguidamente, transferiu-se 1 ml de soro fisiológico estéril (branco) e 1 ml da suspensão para duas cuvete de espectrofotometria de forma a proceder à leitura da densidade óptica (d.o. = 600 nm). Ajustou-se a concentração da suspensão para  $2 \times 10^8$  ufc/ml (cálculo feito de acordo com o volume total necessário à inoculação dos dentes: 10 µL / dente x nº dentes).

---

<sup>1</sup> Factor de diluição só é aplicável quando o volume inoculado é diferente de 1 ml.<sup>1</sup>

Transferiu-se 100 µL de água estéril e cada um dos dentes para microtubos de 1,5 ml, com o objetivo de manter uma atmosfera húmida no interior dos mesmos durante o período de incubação. Inoculou-se o canal radicular dos dentes teste e dos dentes controlo (1, 2 e 3), com 10 µL da suspensão preparada anteriormente e inoculou-se o dente controlo negativo (4) com BHib estéril. Incubou-se a 37°C durante 48 h.

#### Protocolo de desinfeção:

##### Grupo 1 – Hipoclorito de Sódio a 5%

Irrigou-se cada um dos dentes com 0,2 ml de Hipoclorito de Sódio, deixando atuar 20 segundos e repetiu-se o procedimento mais duas vezes. Seguidamente, irrigou-se cada um dos dentes com 1 ml de Tiossulfato de Sódio a 5%, deixou-se atuar por 1 minuto e introduziram-se dois cones de papel esterilizado no canal radicular. Os cones de papel foram transferidos para um tubo com 5 ml de BHib e o dente para outro tubo com 5 ml de BHib e deixou-se incubar a 37°C durante 72 h sob agitação.

##### Grupo 2 - Ácido Peracético a 1%

Irrigou-se cada um dos dentes com 0,2 ml de Ácido Peracético, deixando atuar 20 segundos e repetiu-se o procedimento mais duas vezes. Seguidamente, irrigou-se cada um dos dentes com 1 ml de Tiossulfato de Sódio a 5% e deixou-se atuar por 1 minuto e introduziram-se dois cones de papel esterilizado no canal radicular. Os cones de papel foram transferidos para um tubo com 5 ml de BHib e o dente para outro tubo com 5 ml de BHib e deixou-se incubar a 37°C durante 72 h sob agitação.

##### Grupo 3 - Ácido Peracético a 1% e Terapia fotodinâmica

Irrigou-se cada um dos dentes teste com 0,2 ml de Ácido Peracético a 1%, deixando atuar 20 segundos, repetindo o procedimento mais duas vezes. Lavou-se o canal radicular com 1 ml de água esterilizada e logo de seguida secou-se completamente o canal radicular com cones de papel esterilizados. Procedeu-se à aplicação do fotossensibilizador, Azul de Toluidina, até encher o canal radicular e ativou-se com

recurso ao PDT, com dois ciclos de 30 segundos a um comprimento de onda entre os 620-700 nm. Lavou-se novamente o canal radicular com 1 ml de água esterilizada e fez-se a irrigação de cada um dos dentes com 1 ml de Tiossulfato de Sódio a 3% mais os coadjuvantes da sua ação, Polisorbato 80 e Lecitina, e deixou-se actuar por 1 minuto. De seguida, introduziram-se dois cones de papel esterilizados no canal radicular e transferiram-se para um tubo com 5 ml de BHib e o dente para outro tubo com 5 ml de BHib. Por fim, deixou-se a incubar a 37°C durante 72 h sob agitação.

#### Controlos:

Após a desinfecção, realizaram-se os grupos controlo do respetivo grupo teste. O dente controlo A transferiu-se diretamente para um tubo com 3 ml de BHib. O dente controlo B irrigou-se com 1 ml de Tiossulfato de Sódio a 5 % durante 1 minuto sendo posteriormente transferido para um tubo com 3 ml de BHib. No controlo B do grupo 3, foi feita a alteração da concentração do Tiossulfato de Sódio para 3% juntamente com os coadjuvantes da sua ação, o Polisorbato 80 e Lecitina, também numa concentração de 3%. Para o controlo C, misturou-se num microtubo de 1,5 ml, 1 ml de Tiossulfato de Sódio a 5% para o grupo 1 e 2, e para o grupo 3 o Tiossulfato de Sódio a 3%, Polisorbato 80 e Lecitina (Chemical disinfectants and antiseptics, 2009) , com 0,6 ml do irrigante correspondente a cada grupo, grupo 1 o Hipoclorito de Sódio 5%, e grupos 2 e 3 o Ácido Peracético a 1%, e deixou-se actuar durante 1 minuto. Esta solução foi posteriormente utilizada para irrigar o dente controlo C durante 1 minuto, findo o qual se transferiu o dente para um tubo com 3 ml de BHib. O controlo D transferiu-se diretamente para um tubo com 3 ml de BHib.

#### Análise de eficácia da desinfecção experimental:

Para todos os grupos de estudo avaliaram-se e registaram-se as alterações na turbidez do meio às 24, 48 e 72 h. Semearam-se os inóculos de todos os tubos com crescimento em meio de Slanetz & Bartley (SB) e incubou-se a 37°C durante 24/48 h. Para confirmar a pureza, avaliou-se o crescimento bacteriano em meio SB e através de coloração de Gram.

#### Preparação da amostra para a análise em microscópio de varrimento:

Selecionaram-se dentes correspondentes ao controlo A e D do grupo de estudo 3 (Ácido Peracético a 1% + PDT) , assim como o dente do grupo 2 (Ácido Peracético a 1%) sem crescimento bacteriano e um dente do grupo 3. Prepararam-se os dentes fazendo dois cortes, um corte transversal na porção coronal da raiz e outro longitudinal ao longo de toda a raiz, para promover a divisão em dois fragmentos, através da utilização de peça de mão e disco diamantado. De seguida, foram fixados os fragmentos preparados, em dois discos de metal com recurso a cola Araldite e deixados a secar por 5 horas. Os dentes controlo A e D foram fixados juntos num discos e os restantes foram fixados juntos noutro disco. Posteriormente, colocaram-se os discos com os dentes fixados, na metalizadora, que se inicia criando em primeiro lugar vácuo e de seguida, ajustando a frequência para 5Hz e a intensidade para 13 mA, metalizou-se a amostra presente nos discos, com uma liga de Ouro-Paládio durante 120 segundos por duas vezes. Logo após, introduziu-se a amostra dos dentes controlo no *SEM*. Após a instauração de um ambiente em vácuo, foram obtidas as imagens de microscópio, selecionando como parâmetros as ampliações de 50x, 1000x e 5000x para as imagens dos terço coronal, médio e apical de cada raiz analisada.

#### Análise estatística:

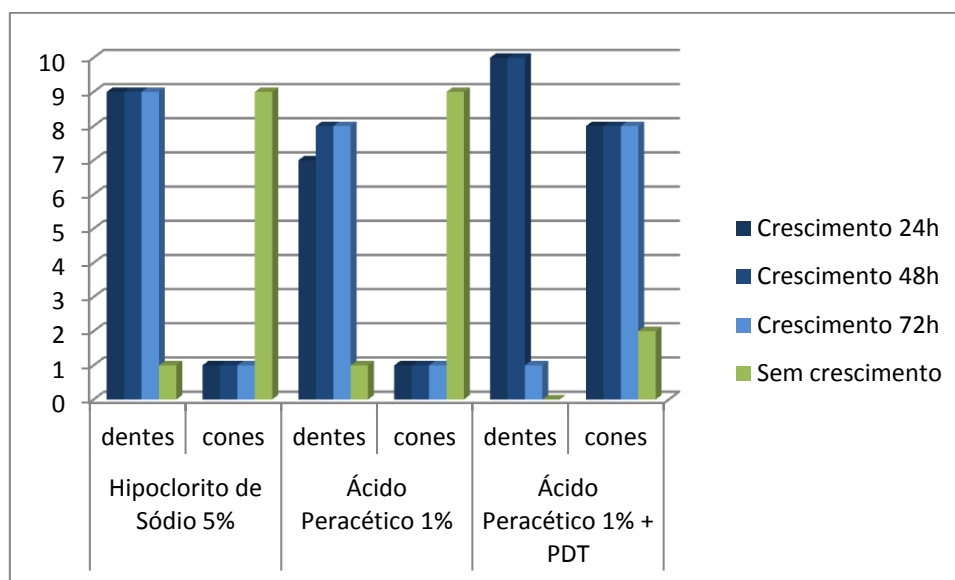
Os resultados foram registados numa base de dados criada em Microsoft Excel e a análise estatística foi efetuada usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS Inc, versão 22, Chicago, USA).

Os testes estatísticos foram avaliados com o nível de significância de 5% para os quais se considerou significativo se  $p \leq 0,05$  e não significativo se  $p > 0,05$ . Realizou-se a análise estatística pelo cruzamento de variáveis com o teste do qui-quadrado.



## 4. Resultados

A desinfecção obtida para cada um dos grupos, analisando os cones e dentes, encontra-se representada no Gráfico 1. Estão representados os grupos correspondentes aos irrigantes usados em cada grupo, analisando o crescimento bacteriano às 24h, 48h e 72h, assim como o não crescimento.



**Gráfico 1 - Representação de todos os grupos de estudo, com discriminação do crescimento bacteriano às 24h, 48h e 72h.**

No grupo 1 (tabela 3) 90% dos dentes apresentou crescimento às 24 h, não sendo observado qualquer alteração até ao final do período de incubação (72 h). Em relação aos cones (tabela 1), registou-se uma percentagem baixa de crescimento (10 %) nas primeiras 24 h, face à amostra de dentes, mantendo-se estável até ao final do período de incubação (72h). Comparando o número de amostras positiva nos dentes e nos cones (Tabela 4), no final do período de incubação, verificou-se que existem resultados estatisticamente significativos ( $p<0,01$ ) (tabela 2).

**Tabela 3 – Análise de crescimento dos dentes e cones no grupo do Hipoclorito de Sódio a 5%**

		Crescimento 24h		Crescimento 48h		Crescimento 72h		Sem crescimento	
Hipoclorito de Sódio 5%	dentes	9	90%	9	90%	9	90%	1	10%
	cones	1	10%	1	10%	1	10%	9	90%

**Tabela 4 – Relação entre dentes e cones do grupo Hipoclorito de Sódio a 5%**

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	12,800 <sup>a</sup>	1	,000

Na tabela 6, verifica-se que no grupo 2 de estudo, desinfecção com Ácido Peracético a 1%, existem resultados com significância estatística ( $p<0,01$ ) quando se comparam os resultados de crescimento nos cones e nos dentes. Na tabela 5, observa-se crescimento às 24 h em 78% dos dentes, tendo sido acrescido outro dente às 48h, perfazendo 89% da amostra até ao final do período de incubação (72 h). Em relação aos cones (tabela 5), registou-se uma percentagem relativamente baixa de crescimento (11 %) nas primeiras 24 h, face à amostra de dentes, mantendo-se estável até ao final do período de incubação (72h). Verificou-se ainda que o Tiosulfato a 5%, não tem eficácia na neutralização da ação do Ácido Peracético a 1%.

Nota: A amostra deste grupo ficou reduzida a 9 dentes, uma vez que durante a execução do protocolo experimental, um dos dentes caiu na base da câmara de fluxo laminar, tendo por essa razão sido excluído, sob pena de se apresentar contaminado e constituir uma viés para o estudo.

**Tabela 5 - Análise de crescimento dos dentes e cones no grupo do Ácido Peracético a 1%**

		Crescimento 24h		Crescimento 48h		Crescimento 72h		Sem crescimento	
Ácido Peracético 1%	dentes	7	78%	8	89%	8	89%	1	11%
	cones	1	11%	1	11%	1	11%	9	100%

**Tabela 6 - Relação entre dentes e cones do grupo Ácido Peracético a 1%**

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	10,889 <sup>a</sup>	1	,001

A tabela 8, apresenta o resultado do tratamento estatístico das observações obtidas no grupo 3, que não apresentam significância estatística ( $p=0,136$ ). O crescimento bacteriano dos dentes apresentava um valor de 100% logo às 24h de incubação, como se pode visualizar na tabela 7. Em relação aos cones (tabela 7), registou-se uma percentagem elevada de crescimento (80 %) nas primeiras 24 h mantendo-se estável até ao término das 72 h de incubação.

**Tabela 7 - Análise de crescimento dos dentes e cones no grupo do Ácido Peracético a 1% e PDT**

		Crescimento 24h		Crescimento 48h		Crescimento 72h		Sem crescimento	
Ácido Peracético 1% + PDT	dentes	10	100%	10	100%	1	10%	0	0%
	cones	8	80%	8	80%	8	80%	2	20%

**Tabela 8 - Relação entre dentes e cones do grupo Ácido Peracético a 1% e PDT**

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	2,222 <sup>a</sup>	1	,136

Pela leitura da tabela 9 pode verificar-se que a comparação entre os resultados obtidos com a utilização dos diferentes irrigantes na desinfecção dos dentes da amostra, não apresenta significância estatística ( $p=0,566$ ). É possível visualizar no Gráfico 2, que houve mais de 80% de crescimento em cada grupo da amostra.

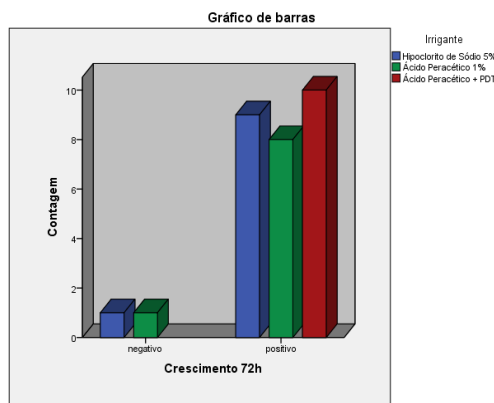


Gráfico 2

Tabela 9 - Relação entre os irrigantes na desinfecção dos dentes da amostra

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,140 <sup>a</sup>	2	,566

Na tabela 10, onde é feita a comparação entre os cones da amostra tratados pelos diferentes irrigantes, observa-se que os resultados apresentam com significância estatística ( $p=0,01$ ) indicando assim, que houve eficácia antimicrobiana na desinfecção dos canais principais por parte dos irrigantes escolhidos para este estudo. No gráfico 3, podemos observar que se registou uma maior contagem de cones sem crescimento bacteriano às 72 horas, do que os que apresentavam crescimento.

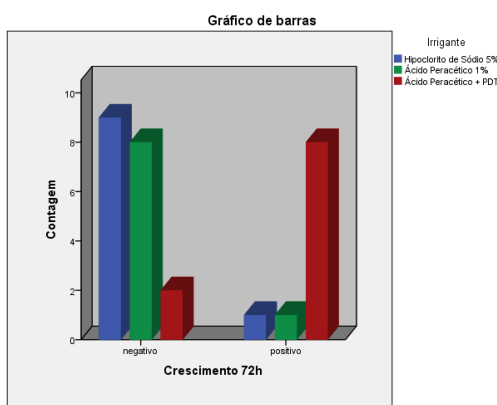
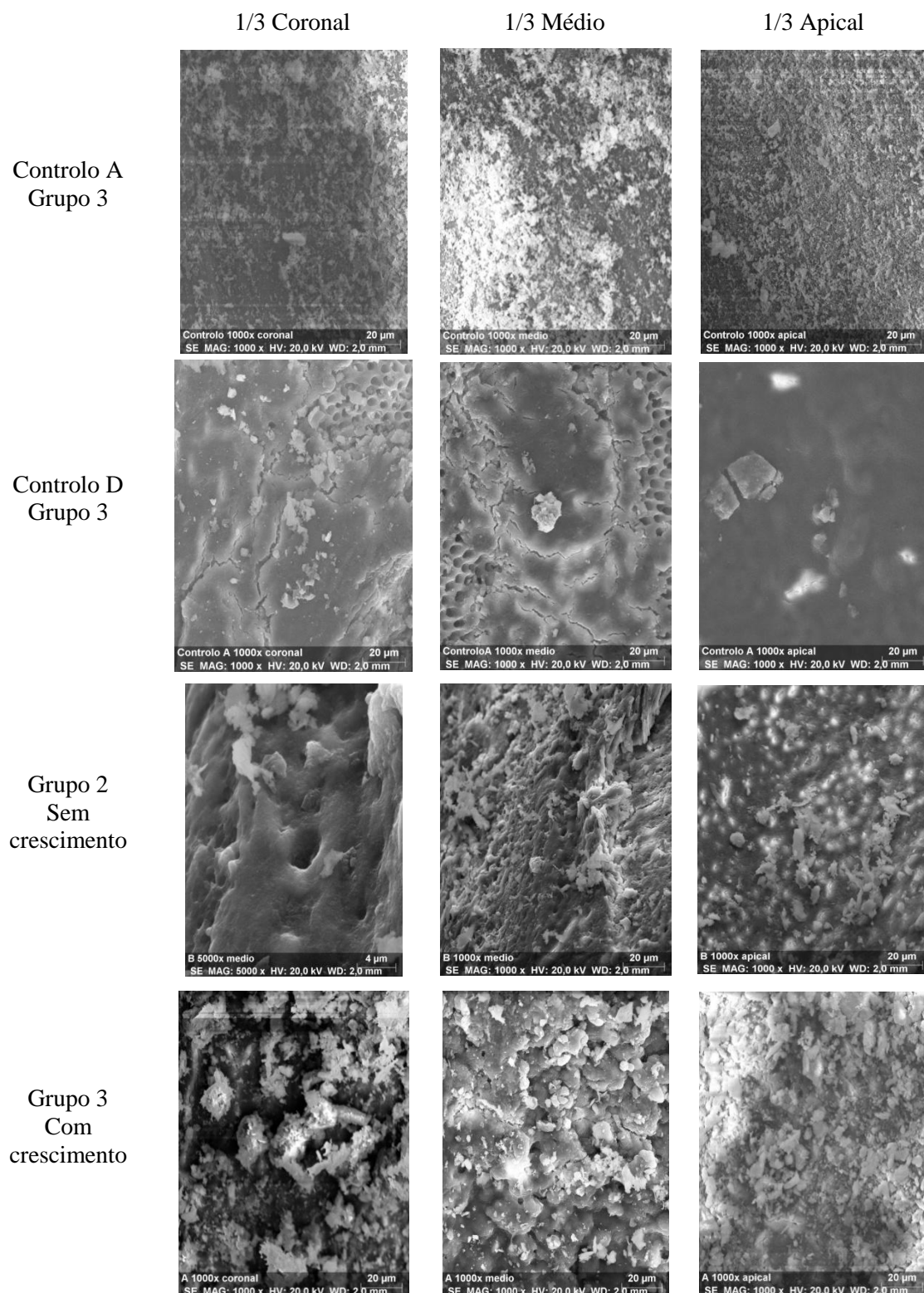


Gráfico 3

Tabela 10 - Relação entre os irrigantes na desinfecção dos cones da amostra

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	14,000 <sup>a</sup>	2	,001



**Figura 1 – Compilação de imagens em SEM, ampliação 1000x, dos dentes controlo A e D e dos grupos 2 e 3**

Nota: A obtenção de imagem do terço coronal do dente do grupo 2 não foi possível por motivos de sobreposição de estrutura dentária decorrente de uma separação da raiz assimétrica. Apresenta-se uma ampliação de 5000x do terço médio da raiz.

## 5. Discussão

Neste estudo avaliou-se a capacidade antimicrobiana dos irrigantes endodônticos Hipoclorito de Sódio a 5% e Ácido Peracético a 1% e também, a eficácia da Terapia Fotodinâmica, como ativador físico, conjugada com o Ácido Peracético tendo como objetivos, avaliar se o Ácido tem, na irradicação de microrganismos, eficácia semelhante à do Hipoclorito de Sódio a 5%, constituindo-se como irrigante alternativo e, ainda, avaliar se o Ácido Peracético possui a capacidade de remover a *smear layer* dos canais radiculares. Para tal, recorreu-se à análise da presença ou ausência de crescimento bacteriano em dentes e em cones de papel introduzidos em meio de cultura BHib. Foi também realizada uma análise, dos dentes representativos da amostra que foi tratada com Ácido Peracético, para determinação da eficiência deste irrigante, na remoção de *smear layer*, , recorrendo a análise de imagens obtidas em microscópio de varrimento.

Na elaboração e planeamento do protocolo usado neste estudo, o tempo, volume e concentração dos irrigantes, foram definidos de modo a aproximar o mais possível o ambiente laboratorial daquele que decorre na prática clínica, a fim de se obterem resultados tão próximos quanto possível daquilo que se obtém em meio intra-oral. Assim, estabeleceu-se que, para o protocolo de irrigação seriam feitas três aplicações de irrigante, com um volume de 20 µl por cada e que seria deixado a atuar dentro do canal durante 20 segundos. De seguida, a avaliação da eficácia dos antimicrobianos seria baseada na interpretação de dados que exibissem a presença ou ausência de crescimento bacteriano, o que seria obtido através da colheita do conteúdo canalicular, após o protocolo de desinfecção, com dois cones de papel que seriam depositados num tubo de ensaio com 5ml de meio de cultura BHib, assim como seria feita a deposição do dente da amostra noutro tubo de ensaio, independente dos cones correspondentes a esse dente. Desta forma, os cones de papel traduzem a qualidade da desinfecção no canal radicular principal, não caracterizando, no entanto, a capacidade do irrigante para eliminar o biofilme que se poderá ter formado na região do foramen apical e porção apical externa da raiz. Concomitantemente, o dente da amostra poderá espelhar, não só a qualidade da desinfecção obtida no canal principal dos dentes, mas também, a eficácia em eliminar a *E. faecalis* de potenciais canalículos acessórios e região do foramen apical.

No grupo 1, fez-se a irrigação com Hipoclorito de Sódio a 5%, uma vez que este representa o *Gold Standard* da irrigação em endodontia. Os resultados obtidos nos cones e dentes, relativamente ao crescimento bacteriano ao fim das 72 horas de incubação, foram trabalhados segundo a análise não-paramétrica com o teste do  $\chi^2$ , para descrever a relação entre o crescimento microbiano registado nos cones e nos dentes da amostra deste grupo. Nesta amostra verificou-se que a relação de desinfeção dos dentes e dos cones exibe significância estatística ( $p < 0,01$ ) pelo que se rejeita a hipótese nula, o que indica que o crescimento bacteriano, nos dentes e nos cones, é diferente, registando-se, neste caso, menor eficácia do irrigante nos dentes.

Consegue observar-se na tabela 3, que o crescimento bacteriano observado nos dentes teve uma elevada percentagem (90%) logo nas primeiras 24h de incubação. Estes resultados poderão colocar a questão de ter havido uma eventual contaminação da superfície externa da raiz durante o procedimento da inoculação. A inoculação dos dentes necessitou de 100  $\mu$ L de água estéril em microtubos de 1,5 ml para se manter uma atmosfera húmida, de modo a que não houvesse desidratação da estirpe. A contaminação dos dentes da amostra foi feita via canal radicular tendo o dente sido colocado, em seguida, dentro do microtubo que já continha água estéril no seu interior. Atendendo aos resultados obtidos, foi suscitada a dúvida sobre se, na inoculação, terá havido extravasamento de *E. faecalis* através do foramen apical, se terá havido saída do inóculo aquando da colocação do dente no microtubo, ou ainda se terá havido contaminação das paredes externas do dente por contacto direto com a água estéril que teria sido contaminada pelo extravasamento do inóculo. Qualquer destas hipóteses pode ter influenciado os resultados obtidos na análise do crescimento bacteriano dos dentes da amostra.

O grupo 2 do estudo, serviu para realizar a análise da eficácia antimicrobiana do Ácido Peracético na concentração de 1%. A amostra deste grupo ficou reduzida a 9 dentes uma vez que, durante a execução do protocolo experimental, um dente caiu na base da câmara de fluxo laminar, tendo, por essa razão, sido excluído sob pena de se apresentar contaminado e constituir um viés para o estudo. Houve também a constatação de que o Tiosulfato de Sódio a 5%, não é eficaz na neutralização da ação do Ácido Peracético a 1%. Este dado foi observado no grupo de controlo positivo, que procura ter crescimento bacteriano de forma a exibir uma neutralização do agente antimicrobiano, mas que neste grupo de estudo, não se verificou. O protocolo definido

para os três grupos foi elaborado de forma a que cada grupo fosse tratado individualmente no espaço de uma semana. Quando, após o registo do resultados obtidos no grupo 2, se verificou a ineficácia de neutralização do Tiossulfato de Sódio 5% em inibir a ação do Ácido Peracético 1%, foram procuradas novas concentrações de tiossulfato e de coadjuvantes da sua ação. Através da consulta da norma EN 1276:2009, Chemical disinfectants and antiseptics. (2009), foram experimentadas as opções de combinação de agentes neutralizadores do Ácido Peracético a 1%, tendo sido definido que o grupo de estudo nº3 iria contar com uma concentração de Tiossulfato de Sódio a 3% mais os coadjuvantes da sua ação, Polisorbato 80 e Lecitina (Chemical disinfectants and antiseptics, 2009).

Os resultados obtidos no grupo 2, apresentam grande semelhança com os resultados do grupo 1, revelando que o Ácido Peracético apresenta um nível de eficácia idêntico ao Hipoclorito de Sódio a 5%. Neste grupo de estudo verificou-se através da análise pelo teste do  $\chi^2$ , que a atividade antimicrobiana apresenta, uma significância estatística de  $p=0,01$ . Isto indica que o irrigante Ácido Peracético a 1%, possui menor eficácia na eliminação de *E. faecalis* em biofilme imaturo, nos dentes da amostra.

Sendo evidente que o resultado antimicrobiano nos cones de papel, que representam apenas a desinfecção do canal radicular principal, é melhor do que nos dentes da amostra, tal pode atribuir-se ao facto de estes apresentarem uma anatomia complexa, nomeadamente pela possível existência de canalículos acessórios, ou a uma eventual contaminação da superfície externa dos dentes.

Segundo Sagsen B., 2012, o Ácido Peracético possui ação oxidativa que leva à desnaturação de proteínas, à rotura das membranas celulares, oxidação de sulfidrilos e formação de ligações enxofre com proteínas, enzimas e outros metabolitos. (Sagsen B., 2012) Uma concentração de ácido de 2,25% é mais citotóxico que uma concentração de 1%, podendo criar erosão dentinária e ser cáustica para a mucosa oral. (Lottanti S., 2009; Sagsen B., 2012; Cord C.B., 2014)

Noutros estudos, verificou-se que uma concentração de 1% de Ácido Peracético, mostrou reduzir cerca de 86% da quantidade total de *Enterococcus faecalis* em 3 minutos, e foi capaz de eliminar por completo a população de *microrganismo* no período de 10 minutos. Estes resultados demonstram o seu potencial antimicrobiano, podendo constatar-se a eficácia deste irrigante na eliminação de colónias de *E. faecalis*,

embora tenha uma ação mais demorada que o Hipoclorito de Sódio (NaOCl) em concentrações de 2,5% que atua em cerca de 30 segundos. (De-Deus G., 2011; Guerreiro-Tanomaru J., 2011; Cord C.B., 2014) Portanto, em estudos *a posteriori*, poderá ser reajustado o tempo de aplicação do irrigante, a fim de obter erradicação total das bactérias inoculadas.

No grupo de estudo nº 3, foi feita a conjugação da ação antimicrobiana do Ácido Peracético com coadjuvante antimicrobiano, a Terapia Fotodinâmica. Neste grupo, o Tiosulfato de Sódio a 3% mais os coadjuvantes da sua ação, Polisorbato 80 e Lecitina (Chemical disinfectants and antiseptics, 2009), exibiu eficácia na neutralização do Ácido Peracético. A análise dos resultados deste grupo indica uma reduzida ação antimicrobiana nos dentes e nos cones, não apresentando significância estatística ( $p=0,136$ ), pelo que se aceita a hipótese nula. A falta de eficácia verificada poderá levantar a questão de ter havido a eventual neutralização da ação do Ácido Peracético a 1% por efeito da aplicação do fotossensibilizador no canal radicular. Poderá também ter havido insuficiência no tempo de permanência do fotossensibilizador dentro do canal radicular, antes de este ser ativado pelo PDT. Existe ainda a possibilidade de, tal como nos restantes grupos de estudo, ter havido uma eventual contaminação da superfície externa da raiz durante o procedimento da inoculação.

O fotossensibilizador usado neste protocolo foi o Azul de Toluidina, que é ativado a um comprimento de onda 620-700 nm emitidos pelo PDT. Na análise da literatura pesquisada, não foram encontrados dados sobre um tempo base de permanência do fotossensibilizador dentro do canal radicular antes de ser ativado, pelo que a técnica adotada para este estudo foi a aplicação de Azul de Toluidina até ao total preenchimento do canal radicular, seguido da direta ativação do mesmo.

Segundo Dworniczek E., 2014, a falta de difusão do fotossensibilizador dentro do biofilme, pode levar à sobrevivência das bactérias nas suas camadas inferiores, podendo destruir total ou parcialmente o biofilme. No entanto, mesmo se uma porção da população microbiana sobreviver, esta estará enfraquecida, tornando-se um alvo fácil para os irrigantes, que poderão ter uma atividade limitada contra biofilmes intactos. (Dworniczek E., 2014) No caso deste estudo em particular, a aplicação do irrigante foi feita previamente à utilização do PDT. Talvez, em estudos posteriores possa testar-se a aplicação do irrigante endodôntico após a aplicação da Terapia Fotodinâmica bem



como, procurar determinar quanto tempo deverá o fotossensibilizador ficar a atuar dentro do canal antes de ser ativado.

Uma revisão no protocolo laboratorial no que concerne aos pontos de frequência de aplicação, volume aplicado e tempo de atuação dentro do canal radicular, para a mesma concentração de irrigante, poderá levar a um melhor desempenho, e alargar a ação do irrigante aos canalículos acessórios, promovendo um melhor resultado antibacteriano.

Neste trabalho foi feito um segundo estudo, que visou analisar se o Ácido Peracético possui ou não a capacidade de remover a *smear layer*, recorrendo à análise qualitativa da morfologia, conseguida através da leitura por microscópio de varrimento (SEM).

Para tal, foram selecionados e preparados dentes correspondentes ao controlo A e D do grupo de estudo 3 (Ácido Peracético a 1% + PDT) , assim como, um dente do grupo 2 (Ácido Peracético a 1%) sem crescimento bacteriano, e um dente do grupo 3 com crescimento bacteriano. Os dentes depois de serem seccionados transversal e longitudinalmente e colados em discos de metal, foram metalizados com uma liga de Ouro-Paládio durante dois ciclos de 120 segundos, de forma a obter uma imagem mais homogénea e estável. De seguida, foram capturadas imagens das porções coronal, média e apical dos dentes introduzidos nos discos. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 50x, 1000x e 5000x para todos os dentes<sup>2</sup>, contudo, no dente correspondente ao Grupo 2, tratado com o Ácido Peracético a 1%, não foi possível obter imagem do terço coronal por motivos de sobreposição de estrutura dentária decorrente de uma separação assimétrica da raiz. Então, exibiu-se no lugar da representação da imagem do terço coronal, uma imagem com ampliação de 5000x do terço médio, de modo a fortalecer a evidência dos resultados exibidos com a ampliação de 1000x. Os resultados de imagem publicados neste trabalho (Figura 1) são representativos do resultados esperados para cada dente, consoante o tratamento previamente estipulado no protocolo experimental.

---

<sup>2</sup> Apenas são apresentadas as fotografias com ampliação de 1000x, para cada dente a cada terço da raiz.

No dente controlo A, tratado apenas com inoculação de *E. faecalis*, observa-se a presença de grandes aglomerados de bactérias presentes na parede do canal radicular principal.

No dente controlo D, controlo negativo, verifica-se a ausência de células microbianas e, a presença de *smear layer*. Os túbulos dentinários visíveis ao lado da superfície de *smear layer*, podem indicar que o canal recebeu pouco estímulo mecânico induzido pela instrumentação endodôntica do canal, com recurso a limas de Ni-Ti, as ProTaper Universal.

No dente do grupo 2, tratado com Ácido Peracético a 1%, sem crescimento bacteriano, observa-se a abertura dos túbulos dentinários, contudo existe dispersa pelo canal radicular, uma matéria inorgânica compatível com resto de dentina que ficou em suspensão. De acordo estudos já realizados, o Ácido Peracético, na presença de matéria orgânica ou em concentrações inferiores a 0,5%, possui capacidade de remoção da *smear layer* e desmineralização da dentina radicular (Lottanti S., Gautschi H., Sener B., Zehnder M., 2009; Cord C.B., 2014; Szczepanski F., 2014) Contudo, e devido à acidez do ácido, o cálcio permanece em solução e não se precipita, sugerindo um fraco poder de quelante deste agente. (Lottanti S., 2009)

No dente do grupo 3, tratado com Ácido Peracético e PDT, onde houve crescimento em todos os dentes da amostra, observa-se abertura dos túbulos dentinários e alargados aglomerados de bactérias.

## 6. Conclusão

O trabalho laboratorial desenvolvido neste estudo, permitiu recolher dados sobre a eficácia antimicrobiana do Ácido Peracético 1%, e sua comparação com a ação do Hipoclorito de Sódio a 5%.

Não obstante a amostra ter dimensões pouco representativas para a obtenção de conclusões com elevada evidência científica, foi possível verificar que o Ácido Peracético possui capacidade antimicrobiana equiparável à do Hipoclorito de Sódio a 5%, constituindo-se assim como potencial irrigante endodôntico alternativo.

Tendo-se procurado testar a possibilidade de aumentar o efeito desinfetante do Ácido Peracético, através da combinação deste irrigante com um potenciador da ação físico (PDT), não se conseguiu demonstrar esse aumento de eficácia, e por outro lado, verificou-se uma redução da desinfecção canalar no grupo tratado com este protocolo. Tal poderá ter resultado de um efeito neutralizador do Azul de Tiliudina, sobre o Ácido Peracético.

O elevado número de dentes contaminados, que se registou em todos os grupos de estudo, poderá indiciar a existência de contaminação destes, por extravasamento de *E. faecalis* através do foramen apical, saída do inóculo aquando da colocação do dente no microtubo, ou ainda por contaminação das paredes externas do dente devido a contacto direto com a água estéril que teria sido contaminada pelo extravasamento do inóculo.

Em estudo complementar realizado, verificou-se que o Ácido Peracético demonstra possuir capacidade de remover a *smear layer* dos túbulos dentinários.

## 7. Referências Bibliográficas

Arias-Moliz M.T., O.-Z. R.-L.-L. (2014). Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J.*, doi: 10.1111/doi: 10.1111/iej.12424.

Baca P., Mendonza-Llamas M. L., Arias-Moliz M. T., Rodriguez M., Ferrer-Luque C. M. (August de 2011). Residual Effectiveness of Final Irrigation Regimens on *Enterococcus faecalis*–infected Root Canals. *JOE*, Volume 37, Number 8.

Bachtiar E. W., Bachtiar B. M., Dewiyaniz S., Akbar S. M. (2015). *Enterococcus faecalis* with capsule polysaccharides type 2 and biofilm-forming capacity in Indonesians requiring endodontic treatment. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*.

Bago I, Plečko V, Gabric´ Panduric´ D, Schauerperl Z, Baraba A, Anic´ I. (2013). Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *International Endodontic Journal*.

Brito P., Souza L. C.,Oliveira J. C., Alves F., De-Deus G., Lopes H. L.,Siqueira, Jr J. F. (2009). 5. Brito P., SouComparison of the Effectiveness of Three Irrigation Techniques in Reducing Intracanal *Enterococcus faecalis* Populations: An In Vitro Study. *JOE - Volume 35, Number 10*.

Chau N. P.T., Chung N-H., Jeon J. G. (2014). *Relationships between the antibacterial activity of sodium hypochlorite and treatment time and biofilm age in early Enterococcus faecalis biofilms*.

Chemical disinfectants and antiseptics. (2009). Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas. *Test method and requirements (phase 2, step 1)*. EN 1276:2009.

Cheng X., Guan S., Lu H., Zhao C., Chen X., Li N., Bai Q., Tian Y., Yu Q. (2012). Evaluation of the Bactericidal Effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG Laser Radiation, and Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) in Experimentally Infected Root Canals; *Lasers in Surgery and Medicine*. 824–831.

Cobankara F. K., Erdogan H., Hamurcu M. (2011). Effects of chelating agents on the mineral content of root canal dentin; Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 112:e149-e154.

Cord C.B., Velasco R., Lima L., Rocha D., Bueno C., Pinheiro S.L. (Março 2014). Effective Analysis of the Use of Peracetic Acid after Instrumentation of Root Canals Contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* , Vol: 40 , Issue 8, 1145 – 1148.

De-Deus G., Souza E.M., Marins J. R., Reis C., Paciornik S., Zehnder M. (2011). Smear layer dissolution by peracetic acid of low Concentration. *International Endodontic Journal*, 44, 485–490.

Dworniczek E., Piwowarczyk J., Seniuk A., Gosciniak G. (2014). Enterococcus – virulence and susceptibility to photodynamic therapy of clinical isolates from Lower Silesia, Poland. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Early Online: 1–8.

Ferrer-Luque C. M., C.-O. A.-M. (2012 ). Residual Activity of Chelating Agents and their Combinations with Cetrime on Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis*. *JOE — Volume 38, Number 6*.

Fonseca M. B., Júnior P., Pallota R., Filho Hely., Dernardin O., Rapoport A., Dedivitis R., Veronezi J., Genovese W., Ricardo A. (2008). Photodynamic Therapy for Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomedicine and Laser Surgery*, Volume 26, Number 3.

Guerreiro-Tanomaru J., Morgental R., Faria-Junior N., Berbert F., Tanomaru-Filho M. (2011). Antibacterial Effectiveness of Peracetic Acid and Conventional Endodontic Irrigants. *Braz Dent J*, 285-287.

Hohscheidt G. L., Bottcher D. E., Parolo C., Montagner F., Grecca F. (2013). Response of *E. faecalis* Biofilms to Different Associations of Auxiliary Substances During Root Canal Preparation: A Confocal Laser Microscopy Analysis; Microscopy Research And Techique 76. 658–662.

Johns D. A., Shivashankar V. Y., Krishnamma S., Johns M. (2014). Use of photoactivated disinfection and platelet-rich fibrin in regenerative Endodontics. *J Conserv Dent.*, 487–490.

Kandaswamy D., Venkateshbabu N. (2010). Root canal irrigants. *J Conserv Dent.*, 256–264.

Koivunen J., Heinonen-Tanski H. (2005). Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Research* 39, 1519–1526.

Leggett M.J., Schwarz J. S., Burke P.A., McDonnell G., Denyer S. P., Maillard J.Y. (November 2014). Resistance to and killing by the sporicidal microbicide peracetic acid. *J Antimicrob Chemother*, doi:10.1093/jac/dku445.

Lottanti S., Gautschi H., Sener B., Zehnder M. (2009). Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *International Endodontic Journal*, 335–343.

Ok E., Ertas H., Saygili G., Gok T. (2013). Effect of Photoactivated Disinfection on Bond Strength of Root Canal Filling. *JOE — Volume 39, Number 11, November*.

Olivi G., DiVito E., Peters O., Kaitsas V., Angiero F., Signore A., Benedicenti S. (2014). Disinfection efficacy of photon-induced photoacoustic streaming on root canals infected with *Enterococcus faecalis*: An ex vivo study. *JADA* 2014, 145(8):843-848.

Ordinola-Zapata R., Bramante C. M., Garcia R., Andrade F., Bernardineli N., Moraes I. G., Duarte M. (2013). The Antimicrobial Effect of New and Conventional Endodontic Irrigants on Intra-orally Infected Dentin. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71: 424–4.

Ozdemir H. O., Buzoglu H. D., Calt S., Stabholz A., Steinberg D. (2010). Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite Irrigation on *Enterococcus faecalis* Biofilm Colonization in Young and Old Human Root Canal Dentin: In Vitro Study. *JOE — Volume 36, Number 5, May 2010*.

Park E., Lee C., Bisesi M., Lee J. (2013). Efficiency of peracetic acid in inactivating bacteria, viruses, and spores in water determined with ATP bioluminescence, quantitative PCR, and culture-based methods. *JWH-D-13-00002*.

Pechacek N., Osorio M., Caudill J., Peterson B. (14 de 12 de 2014). *Evaluation of the toxicity data for peracetic acid in deriving occupational exposure limits: A minireview*.

Obtido de Toxicol. Lett. (2015); <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.014>:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.014>

Reddy J., Latha P., Gowda B., Manvikar V., Vijavalaxmi D. B., Ponangi K. C. (2014). Smear layer and debris removal using manual Ni-Ti files compared with rotary Protaper Ni- Ti files - An In-Vitro SEM study. *J Int Oral Health*. 2014 Feb, 6(1): 89–94.

Sagsen B., Ustun Y., Aslan T., Çanakçı B. C. (2012). The Effect of Peracetic Acid on Removing Calcium Hydroxide from the Root Canals. *JOE — Volume 38, Number 9, September*.

Sczepanski F, Sczepanski CR, Berger SB, Consani RL, Gonini-Junior A, Guiraldo RD. (2014). Effect of sodium hypochlorite and peracetic acid on the surface roughness of acrylic resin polymerized by heated water for short and long cycles. *Eur J Dent*, 8:533-7.

Souza L., Brito P., Oliveira J., Alves F., Moreira E., Sampaio-Filho H., Rôças I., Siqueira Jr. J. (February 2010). Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. *JOE - Volume 36, Number 2*.

Tennert C., Feldman K., Haamann E., Al-Ahmad A., Follo M., Karl-Thomas W., Hellwig E., Altenburger M. J. (2014). Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. *BMC Oral Health*. 2014, 14(1): 132.

Wang Z., S. Y. (2014). Dentin Extends the Antibacterial Effect of Endodontic Sealers against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *JOE — Volume 40, Number 4, April 2014* .

Yao N., Zhang C., Chu C. (2012). Effectiveness of Photoactivated Disinfection (PAD) to Kill *Enterococcus faecalis* in Planktonic Solution and in an Infected Tooth Model. *Photomedicine and Laser Surgery Volume 30, Number 12, 2012*.

Yap B., Zilm P. S., Briggs N., Rogers A. H., Cathro P. C. (2014). The effect of sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* when grown on dentine as a single- and multi-species biofilm. *Aust Endod J* 2014, 40: 101–110.

Zand V. Milani A. S., Amini M., Barhaghi M., Lofti M., Rikhtegaran S., Sohrabi A. (2014). Antimicrobial Efficacy of Photodynamic Therapy and Sodium Hypochlorite on Monoculture Biofilms of *Enterococcus faecalis* at Different Stages of Development. *Photomedicine and Laser Surgery: Vol.32, Number 5*.

Zhao Y., Knøchel S., Siegumfeldt H. (2014). In situ examination of *Lactobacillus brevis* after exposure to an oxidizing disinfectant. *Front Microbiol.* 2014, 5: 623.



## 8. Anexo A – Tabelas e Gráficos

A determinação do número de ufc/ml numa amostra de turbidez desconhecida, pode ser calculado através da elaboração de uma curva de calibração. Esta curva foi construída através da relação densidade óptica (600 nm) *versus* número de ufc/ml calculado após diluição de uma suspensão inicial.

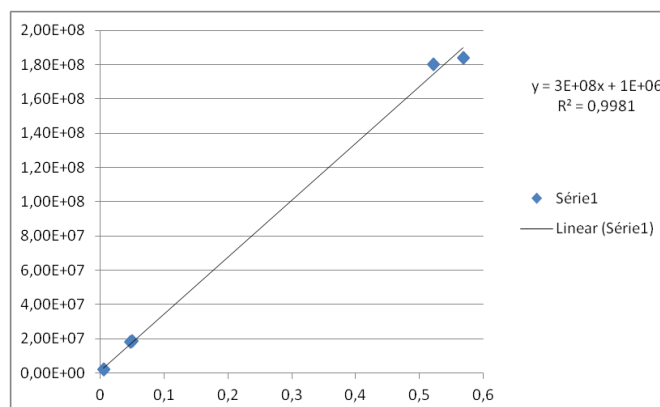


Gráfico 4 – Curva de calibração

Tabela 11 – Tabela de absorvâncias

1º Dia		2º dia		3º dia	
Diluições	ufc/ml	Diluições	ufc/ml	Diluições	ufc/ml
0	1,84E+08	0	1,80E+08	0	2,85E+08
1	1,84E+07	1	1,80E+07	1	2,85E+07
2	1,84E+06	2	1,80E+06	2	2,85E+06
3	1,84E+05	3	1,80E+05	3	2,85E+05
4	1,84E+04	4	1,80E+04	4	2,85E+04
5	1,84E+03	5	1,80E+03	5	2,85E+03
				6	285

Resultados

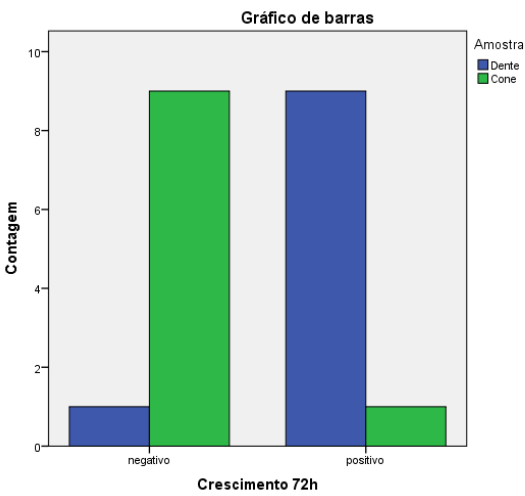


Gráfico 5 – Grupo 1 - Hipoclorito de Sódio 5%, cones e dentes

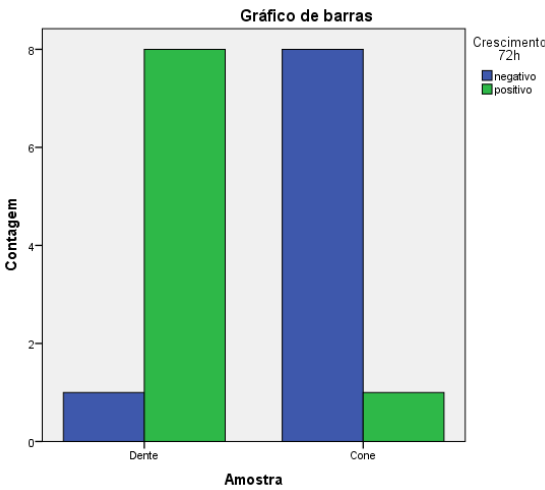


Gráfico 6 - Ácido Peracético 1%, cones e dentes

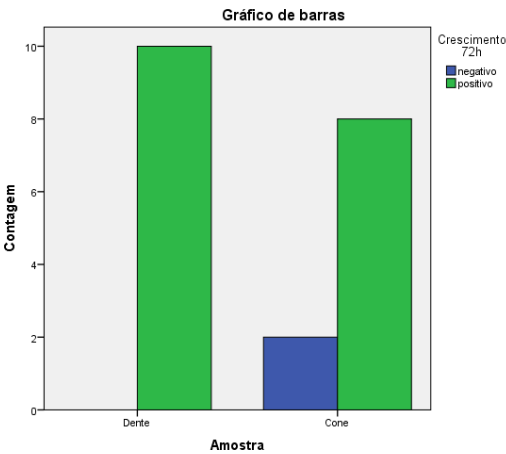
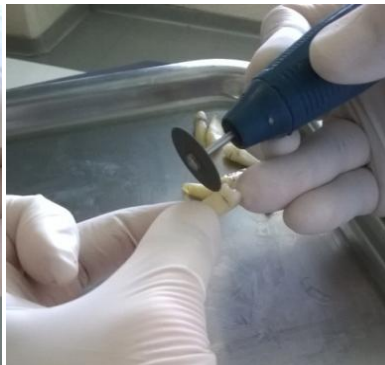


Gráfico 7 - Ácido Peracético 1% e PDT, cones e dentes

## 9. Anexo B – Figuras



**Figura 2 – Estabelecimento da linha guia para secção da coroa**



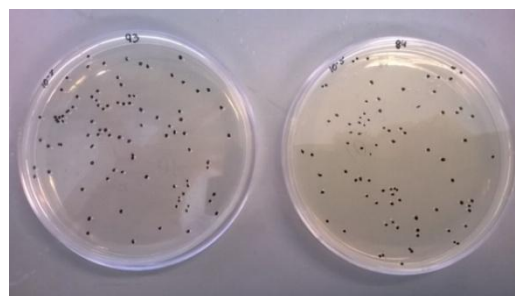
**Figura 3 - Secção da coroa**



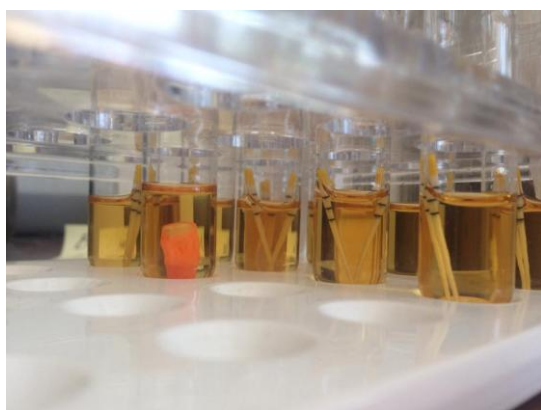
**Figura 4 – Comprimento Radicular**



**Figura 5 - Inoculação em meio TSA**



**Figura 6– Contagem de microcolónias**



**Figura 7 - Dente e cones não contaminados**



**Figura 8 - Dente e cone contaminados (Turbidez do meio)**



**Figura 9 - Metalizadora**



**Figura 10 - -- Processo de metalização**



**Figura 11 - Amostra com película de liga Ouro-Paládio**



**Figura 12- SEM**



**Figura 13- SEM**